

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520121153132

UDC _____

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

Hedgehog 信号和自噬在多发性骨髓瘤化疗耐药机制中的作用
研究

The role of hedgehog pathway and autophagy in the mechanism
of acquired chemoresistance in multiple myeloma

黄潇

指导教师姓名: 鹿全意

专 业 名 称: 内科学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 5 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

_____另外,该学位论文为

() 课题(组)的研究成果,获得
() 课题(组)经费或实验室的资助,在
() 实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
第一部分	1
Hedgehog 信号过表达在骨髓瘤化疗耐药机制中作用的研究	1
材料与方法	2
一、材料及设备.....	2
二、实验方法.....	3
结果.....	9
1、Hh 信号通路组分在骨髓瘤细胞系中的表达.....	9
2、由 8226/S 细胞系建立的阿霉素耐药细胞系 8226/R	10
3、Hh 信号通路在 8226/R 细胞系中的异常激活.....	11
4、Hh 通路下游靶点和 MDR 相关蛋白在 RPMI 8226/R 中的表达	12
5、阻断 Hh 信号对骨髓瘤 8226/R 细胞耐药性的影响.....	14
6、Hh 信号阻断剂影响骨髓瘤 8226/R 细胞化疗药物敏感性的机制.....	17
讨论.....	19
第二部分	22
靶向 Hh 信号途径增加骨髓瘤细胞化疗敏感性的机制研究.....	22
一、材料及设备.....	23
二、实验方法.....	24
结果.....	26
1、GANT61 与 DOX 协同抑制 8226/R 细胞增殖.....	26
2、GANT61 改变 P-gp 的生物学行为	28
3、GANT61 对 8226/S 和 8226/R 细胞周期和细胞周期相关蛋白表达的 影响.....	31
4、GANT61 对 8226/S 和 8226/R 细胞凋亡的影响及其机制	35
讨论.....	38
第三部分	41
自噬在多发性骨髓瘤化疗耐药机制中的作用	41

材料与方法	42
一、材料及设备.....	42
二、实验方法.....	43
结果.....	46
1、饥饿条件下 8226/S 细胞和 8226/R 的自噬活性	46
2、阻断 Hh 信号对骨髓瘤细胞自噬活性的影响.....	48
3、3-MA 阻断自噬增强 GANT61 介导的细胞凋亡.....	51
4、siRNA 沉默 Beclin 1 表达增强 DOX 和 GANT61 对 8226/R 的抗肿瘤 作用.....	53
讨论.....	56
参考文献	59
致谢.....	64
攻读学位期间发表的论文	65

摘 要

在多发性骨髓瘤的临床治疗中，化疗耐药现象仍然是治疗失败的主要原因之一。为了更好地了解多发性骨髓瘤的化疗耐药性及相关的机制，我们建立了阿霉素(doxorubicin, DOX)耐药的细胞系多发性骨髓瘤细胞系 RPMI 8226/R (doxorubicin-resistant cell line), DOX 对 8226/R 的半数抑制率(IC₅₀)是对 DOX 敏感的细胞系 RPMI 8226/S (chemosensitive cell line) 的 5~6 倍。我们发现在多发性骨髓瘤耐药性的诱导过程中存在 Hedgehog(Hh)信号通路的活化，即 Hedgehog 信号通路在 8226/R 中的表达量显著高于 8226/S, Hh 的过表达能够诱发骨髓瘤的对化疗药物的抵抗，而阻断 Hh 信号通路能够逆转骨髓瘤的化疗耐药。Hh 抑制剂也能干扰 8226/R 细胞系中 P-糖蛋白 (P-gp) 和多药耐药相关蛋白 MRP1 的表达，并引起 8226/R 和 8226/S 中 PI3K/AKT (phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)) 和 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 信号通路表达量不同程度的降低，我们推断这些信号通路之中可能存在交叉作用导致耐药性的发生。最后，我们发现 Hh 信号通路的阻断能够显著地减少 VEGF 和 IL-6 等细胞因子在 8226/R 细胞系中的表达。因此，Hh 信号通路是一种能逆转多发性骨髓瘤多药耐药的新靶点。

我们的研究表明 GANT61 通过阻断 Gli 转录子的功能而对 Hh 产生高选择性抑制作用，能够干扰膜结合药物转运体蛋白 P-gp 的表达，增强阿霉素(DOX)的细胞毒性作用，引起细胞内的 DOX 蓄积而对 DOX 耐药的 8226/R 细胞产生较大的逆转耐药作用。细胞周期的分析显示通过调节细胞周期相关蛋白，GANT61 能够抑制 MM 耐药细胞的 S 期，并诱导 G2/M 期阻滞。我们用 FASC 分析显示相对于化疗药敏感细胞 8226/S, GANT61 能够诱导 8226/R 细胞产生更强的凋亡。Western 结果显示 GANT61 作用于 8226/S 和 8226/R 两组细胞后，p53 及其磷酸化水平，前凋亡蛋白 Bcl-2 家族成员在 8226/R 细胞中显著升高，其诱导的线粒体介导的和死亡受体介导的凋亡途径在 8226/R 细胞中显著激活。GANT61 作用后 Fas 受体及其下游的 caspase3 蛋白在 8226/R 细胞的表达较 8226/S 细胞高。

因此,我们认为 Hh 抑制剂 GANT61 能作为一种新的能够单独逆转耐药, 和其他化疗药物联用逆转耐药的有效药物。

已经证实自噬在多种肿瘤化疗的过程中被激活, 但自噬在阿霉素(DOX)诱导的多发性骨髓瘤(MM)中的多药耐药(MDR)中所起的作用仍不甚明了。Hh 信号通路在包括 MM 在内的许多肿瘤中异常活化, Hh 信号通路能否调控自噬仍有待进一步论证。本次课题的目的在于探讨自噬在 DOX 敏感 MM 细胞 8226/S 和耐药细胞 8226/R 两组细胞系的活性差别。分别测定饥饿和 Hh 信号抑制剂 GANT61 处理后观察自噬的变化。在饥饿和 GANT61 处理后, AO 染色、免疫荧光和 Western blot 结果显示, 自噬活性在 8226/R 细胞中较 8226/S 组细胞中显著增高。GANT61 能够显著抑制 MM 细胞 8226/R 的增殖从而逆转多药耐药(MDR), 这可能与 GANT61 能够在 8226/R 细胞中显著诱导自噬性细胞死亡(II 型细胞死亡)有关。有趣的是, 当用自噬抑制剂 3-MA 和小干扰 RNA(siRNA)沉默自噬相关基因 Beclin1 后, GANT61 诱导的耐药细胞 8226/R 的凋亡显著增高。总之, 我们的结果显示自噬活性的增高在 DOX 诱导的 MM 的 MDR 中扮演重要作用, 阻断自噬与 Hh 信号通路能够增强化疗药物在耐药细胞中的敏感性, 对临床 MM 病人的 MDR 治疗有重要的参考价值。

关键词: Hedgehog 信号; 骨髓瘤; 化疗耐药; 分子靶向; GANT61; 自噬; 机制

ABSTRACT

Resistance to chemotherapy remains one of the major challenges in the clinical management of multiple myeloma (MM). To better understand the drug mechanisms and resistance pathways in MM, we established a doxorubicin (DOX)-resistant cell line (8226/R) with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) about five- to six-fold that of a chemosensitive cell line (8226/S). Interestingly, we found the chemotherapy-resistant phenotype of MM cells was associated with the activation of the Hedgehog (Hh) pathway, and this activation was less pronounced in chemosensitive cells. These components which inhibit Hh pathway also apparently interfered with membrane-bound drug transporter proteins (*e.g.*, P-glycoprotein [P-gp or ABCB1]) and multidrug resistance-associated proteins (*e.g.*, MRP1 or ABCC1). We determined that an inhibition of the Hh-pathway-induced downregulation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways indicated a cross-talk between these signaling pathways. Our results also suggested that the inhibition of the Hh pathway modified the expression of cytokines (*e.g.*, vascular endothelial growth factor [VEGF], interleukin-6 [IL6]). We identified the Hh pathway as an essential component in DOX resistance in MM, and we suggest targeting the Hh pathway as it is an interesting therapeutic avenue for overcoming multi-drug resistance (MDR) in MM.

Here, we report that GANT-61, a novel small molecule acting in the nucleus to block Gli function, which shows a high degree of selectivity for HH/Gli signaling, interferes with membrane bound drug transporter proteins P-glycoprotein and synergistically enhances the cytotoxicity of DOX, causes accumulation of DOX in doxorubicin-resistant cell line, 8226/R. A cell cycle analysis suggest that GANT61 suppresses the S phase of drug-resistant MM cell line, induces G2/M phase cycle arrest, adjusts the relevant cell cycle proteins. We used the FACS analysis to demonstrate that GANT-61 induced apoptosis was significantly increased in 8226/R

cells than chemosensitive cell line, 8226/S cells. Western blots showed that p53 expression and phosphorylation, as well as the expression of anti-apoptotic Bcl-2 family members were significantly increased in 8226/R cells, initiating the mitochondria-mediated and death receptor-mediated apoptotic pathways were induced by GANT-61. In addition, upon GANT-61 treatment of 8226/R cells, the FAS receptor and their downstream targets caspase-3 were activated compared to 8226/S. Therefore, our findings show the Hh inhibitor GANT-61 might serve as a new agent for reversing drug resistance alone or in combination with other drugs.

Autophagy is activated in many tumor cells while treated with chemotherapeutic drugs, but the role of autophagy in acquired multi-drug resistance (MDR) of human multiple myeloma (MM) to doxorubicin-based chemotherapy remains to be clarified. Aberrant activation of Hh signaling has been implicated in several human cancers including MM, it remains unknown whether Hh signaling is able to regulate autophagy. Our aim was to address that question by surveying the autophagic activity in 8226/S and 8226/R. Autophagic process was examined in 8226/S and 8226/R cells treated with starvation and GANT61. Acridine orange (AO) labeled formation of acidic vesicular organelles (AVOs) detected by flow cytometry were observed in starvation and GANT61 treated cells, especially in 8226/R. LC3-II was more abundant in 8226/R than in 8226/S cells measured by Western blotting and fluorescence microscopic examination. GANT61 significantly activated autophagic cell death (programmed cell death type II) in 8226/R cells, which could mean the reversing of MDR in MM. Interestingly, GANT61-mediated apoptotic cell death was further potentiated by pretreatment with autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) or small interfering RNA against the autophagic gene beclin1 in 8226/R. Collectively, our data suggest that upregulation of autophagy plays a major role in multidrug resistance of 8226/R cells induced by DOX, decreased autophagy concomitant with Hh signaling inhibition may strengthen the efficiency of chemotherapeutic strategies in chemoresistant MM cells, which may be of immense value for the clinical management of MM patients with MDR.

Key words: Hedgehog signal pathway; multiple myeloma; chemoresistance; GANT61; Autophagy; mechanism

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士论文摘要库

第一部分

Hedgehog 信号过表达在骨髓瘤化疗耐药机制中作用的研究

多发性骨髓瘤（MM）是一种以骨痛、贫血、肾功能不全、感染、高钙血症为主要表现的浆细胞恶性增殖性疾病。传统化疗和高剂量化疗，以及新出现的治疗方案如硼替佐米、沙利度胺、来那度胺、自体干细胞移植等均不能有效治愈 MM。目前 MM 治疗失败的主要原因仍然是化疗药物的耐药性的产生，因此寻找一种有效的能够逆转化疗耐药，有效减少化疗药物的剂量和副作用的疗法仍然是 MM 临床研究的重大课题。

MM 细胞耐药性产生的准确机制现在仍不清楚。目前认为骨髓瘤细胞和骨髓基质细胞的相互作用是骨髓瘤细胞生物学行为的主要机制。在骨髓瘤及微环境细胞中普遍存在细胞因子的分泌如 VEGF、IL-6、IGF 等的高表达，这些细胞因子直接或间接影响 MM 细胞的自分泌和旁分泌途径，最终导致 MM 对抗肿瘤药物耐药性的产生[1-3]。细胞因子引起信号通路的变化如 JAK/STAT3、PI3K/Akt、Ras/MEK/MAPK 均能引起骨髓瘤细胞的增殖和存活[4-7]。

治疗肿瘤耐药的主要挑战之一是以信号通路网络为靶点的治疗，其中涉及一些少见信号通路的交互作用。Hh 信号通路是一种介导肿瘤发生的重要介质，在多种肿瘤如皮肤、大脑、肺、胰腺、前列腺、胃肠道和血液系统肿瘤中扮演重要角色[8-13]。Sonic (Shh), Desert (Dhh), and Indian (Ihh) Hh 是 Hh 信号通路的三种配体。一般情况下，通过受体 Patched-1 (Ptch1) 对跨膜七次蛋白 smoothened (Smo) 的阻断作用，Hh 处于一种抑制状态。而当 SMO 活化后，通过转录因子及下游信号通路的作用引起细胞周期的变化，胶质瘤相关的癌基因同源物[GLI]1, GLI2, GLI3 是其中重要的转录因子。Hh 通路能影响细胞的分化、增殖、凋亡，而近期的研究表明 Hh 信号通路能促进成神经管细胞瘤、前列腺癌、乳腺癌和白血病细胞耐药性的形成[14-17]。Hh 通路激活诱导的耐药可能与三磷酸腺苷结合盒(ABC)介导的药物外排有关，并为克服 MDR 提供了一个可能的机制。

Hh 信号通路是否能调控 MM 细胞的增殖和克服 MM 的耐药仍悬而未决，本次的研究旨在揭示 Hh 信号通路在化疗药物耐药的 MM 中的潜在作用。我们比较 Hh 信号通路在阿霉素敏感 8226/S 和阿霉素耐药 8226/R 细胞系中表达量，初步探究 MAPK/ERK 和 PI3K/Akt 信号通路与 Hh 信号通路之间可能的相互作用。由于 IL-6、VEGF、STAT3 与化疗耐药性的相关性，进一步验证 Hh 信号通路的阻断能否引起相关细胞因子的变化。由于 Hh 信号通路诱导的耐药性是由 P-gp 决定的，我们推断 Hh 信号通路的阻断能在逆转 MM 的化疗耐药性中成为一个非常有前景的治疗策略。

材料与方法

一、材料及设备

1、细胞系

人骨髓瘤细胞株 RPMI8226 细胞，购自中科院上海细胞库。

2、仪器和设备

名称	生产公司
Steril GaRDIII 超净工作台	美国 Baker 公司
细胞培养箱 (RC03000T-5V)	美国 Thermo 公司
倒置显微镜	日本 Olympus 公司
荧光显微镜	日本 Olympus 公司
PCR 扩增仪 (普通 mycycler)	美国 BIO-RAD 公司
荧光定量 PCR 仪	美国 ABI 公司 7500 型
普通 PCR 仪	美国 BIO-RAD 公司
核酸蛋白测定仪	美国 Thermo 公司
蛋白电泳仪	美国 BIO-RAD 公司
凝胶图像及分析系统 (GEL DOC XR)	美国 BIO-RAD 公司
超声波细胞粉碎仪 (UC130PB)	美国 SONICS 公司
全波长紫外/可见光扫描分光光度计	美国 NanoDrop 公司
PowerPac300 型电泳仪	美国 BIO-RAD 公司
TE77 型半干电转移系统	瑞典 Amersham 公司
FX-302 型暗箱式紫外检测仪	上海复星高科技公司
酶标仪	美国 BIO-RAD 公司

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.